

Oponentní posudek

na disertační práci Mgr. René Endlichera – *Studium změn energetického metabolismu hepatocytů: působení oxidačního stresu a trijodtyroninu*.

Předkládaná disertační práce je členěna klasickým způsobem na úvod a teoretickou část o současných znalostech studované problematiky, cíle, užití metody, výsledky, diskusi, závěry a seznam použité literatury. Rozsah disertace je 111 číslovaných stran, kde je zahrnuto 12 obrázků v teoretické a metodické části, a dále 32 grafů a 2 tabulky, které dokumentují získané výsledky. Autor uvádí 193 citací (především zahraniční) literatury. Celá práce je uspořádána přehledně a grafická úprava dosahuje vysoké úrovně.

a) Aktuálnost zvoleného tématu

Autor řešil problematiku energetického metabolismu hepatocytů a izolovaných jaterních mitochondrií. Zaměřil se na modelové oxidační poškození terciálním butylhydroperoxidem (*t*-BHP), který nepodléhá odbourávání mitochondriální katalázou a je proto vhodný pro hodnocení poškození buněk. V mitochondriích se především zaměřil na studium pórů přechodné permeability (MTPT), jejichž otevření se považuje za součást mechanismů, které indukují poškození jaterních buněk a mají tak velice úzkou spojitost s apoptosou a nekrosou buněk. Dále autor sledoval v pokusech (*in vitro* i *in vivo*) ovlivnění metabolismu jaterních buněk hormonem štítné žlázy, trijodtyroninem (T_3), o kterém je známo, že zvyšuje aerobní metabolismus a je i odpovědný za zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů.

Protože není pochyb o životně důležité funkci jater v organismu a jejich oxidačním poškození v průběhu metabolismu nejrůznějších látek tělu vlastních i cizorodých, domnívám se, že téma disertační práce bylo zvoleno velmi vhodně.

b) Zvolené metody zpracování

Autor přizpůsobil všechny zvolené metody cílům své práce. Navázal na dřívější studie laboratoře zaměřené na sledování mechanismů hepatotoxického působení oxidačního stresu na izolovaných hepatocytech. Již publikované nálezy ověřoval na intaktních (na kolagen fixovaných) hepatocytech v primární kultuře a na mitochondriích izolovaných z jater laboratorního potkana kmene Wistar. Pomocí stanovení laktátdehydrogenasy posuzoval poškození plasmatické membrány hepatocytů v primárních kulturách. Produkty lipidových peroxidací v médiu kultivovaných hepatocytů (a tím i stupeň oxidačního poškození) stanovoval spektrofotometricky jako množství látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. Membránový potenciál mitochondrií měřil pomocí dvou fluorescenčních sond (Rhodaminu 123 a Safraninu) na fluorescenčním spektrofotometru. Pro měření respirace hepatocytů permeabilizovaných digitoninem nebo izolovaných jaterních mitochondrií použil Clarkovu kyslíkovou elektrodu. Turbidimetrickou metodu, která měří pokles absorbance suspenze

mitochondrií, autor použil na stanovení bobtnání mitochondrií a hodnocení funkce MPTP. Statistickou významnost získaných výsledků potvrdil ANOVA testem.

Použité metody jsou adekvátní k získání odpovědi na položené otázky.

c) *Výsledky a získané nové poznatky*

Výsledky jsou prezentovány srozumitelnou formou. Každá kapitola je členěna tak, aby nálezy navazovaly na jednotlivé kladené cíle. Tabulky i obrázky jsou umístěny k odpovídajícímu textu. Navazující kapitola Diskuse je věcná a plně v souladu se zaměřením kapitoly, kde autor vlastní nálezy dává do souvislosti s nálezy ve světové literatuře. Závěry na necelých dvou stranách shrnují dosažené výsledky.

Autor doplnil dřívější nálezy oxidačního poškození hepatocytů *t*-BHP a ověřil je na intaktních hepatocytech v primární kultuře. Potvrdil vysokou citlivost NADH-dependentních substrátů respiračního řetězce vůči oxidačnímu poškození. Vliv *t*-BHP dále specifikoval na mitochondriích izolovaných z jater, kde srovnal inhibice čtyř různých NADH-dependentních substrátů s FAD-dependentním substrátem sukcinátem. Zjistil, že nejcitlivějším substrátem k působení *t*-BHP byl jednoznačně palmitylkarnitin. Zcela novou metodu (derivaci klasických křivek) autor rozpracoval a použil pro hodnocení funkce MPTP. Autor získal velké množství přesných údajů o vzájemném působení Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Cyklosporinu A a *t*-BHP na fungování MPTP. Prokázal rovněž aktivační působení podaného T_3 (v pokusech *in vitro* a *in vivo*) na MPTP. Při srovnání fungování MPTP v mitochondriích dvou různých tkání (jater a srdce) určil významný rozdíl v citlivosti těchto tkání na koncentraci Ca^{2+} , když ukázal 7x vyšší rychlost bobtnání u jater.

Autor řešil aktuální téma poškození jaterní tkáně lipidovou peroxidací. Je proto zřejmé, že každá získaná informace v této oblasti je důležitá a přispívá k detailnějšímu poznání všech zúčastněných mechanismů i možné nápravě patologických projevů. Část získaných výsledků již byla publikována (viz autoreferát), a prošla tak recenzním řízením. Proto je má úloha oponenta disertační práce značně usnadněna.

d) *Splnění vytčených cílů*

Cíle práce autor rozdělil do šesti specifických bodů, které postupně plnil v logickém sledu. Tyto cíle byly dále rozpracovány do jednotlivých podkapitol výsledků a diskutovány.

Domnívám se, že konkrétní úkoly, které si autor položil, byly splněny.

K předložené práci mám následující připomínky a dotazy.

- Autor optimalizuje turbidimetrickou metodu pro měření bobtnání mitochondrií tím, že primární data křivek derivuje. Chybí mně alespoň jedna ukázková tabulka s uvedenými konkrétními daty (počátek nástupu bobtnání po přidání Ca^{2+} , maximální rychlost bobtnání) odečtenými z této derivované křivky. V případě grafu 14 nevidím výhodu derivované křivky.
- V kapitole 5.4.2.2. *Vliv PO_4^{3-} na funkci MPT* (str. 69) se autor zmiňuje o přidání chelatačního činidla EGTA, ale v popisu ke grafu 14 (str. 70) je uvedena EDTA. Podobná záměna (EDTA místo EGTA) je patrně i na str. 62.

- V kapitole 5.4.4. *Tkáňová specifita citlivosti MPTP vůči Ca^{2+}* autor porovnává citlivost mitochondriálních pórů přechodné permeability jater a srdce. V metodách však izolace srdečních mitochondrií zmíněna není. Prováděla se obdobně a ve stejných roztocích jako izolace jaterních mitochondrií? Zkoušel autor připravit a porovnat mitochondrie ještě z nějaké další tkáně? Pokud ano, s jakým výsledkem?
- Vytknout bych pouze chtěla anglické popisky u obrázků v teoretické části práce, protože všechny uváděné anglické názvy mají rovněž české ekvivalenty. I když se často jedná o převzaté obrázky, doporučovala bych v disertační práci v češtině popisky rovněž v češtině.

Autor jednoznačně prokázal, že má hluboké teoretické znalosti i schopnost samostatné vědecké práce. Doporučuji proto disertační práci Mgr. René Endlichera k obhajobě.

V Praze dne 26. května 2010

MUDr. Hana Rauchová, CSc.

Fyziologický ústav, v.v.i.
Akademie věd České republiky